

EGCG 抑制卵巢癌细胞 RASSF1A 基因 甲基化并上调其表达

申清香,魏付桥

(南华大学第二附属医院 妇产科,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对卵巢癌细胞系 A2780 Ras 相关区域家族 1 基因(RASSF1)甲基化及其表达的影响。 **方法** 体外培养 A2780 细胞,用 0、10、30 和 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 与 A2780 细胞孵育 24~72 h,采用甲基化特异性 PCR(MSP)检测 RASSF1A 基因启动子区域的甲基化改变情况;提取 EGCG 处理后 A2780 细胞的 RNA,用逆转录 PCR(RT-PCR)检测 RASSF1A 的表达水平。 **结果** 静息状态下,MSP 结果显示 A2780 细胞可检测出 RASSF1A 基因启动子区域有明显的甲基化条带,当与 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 孵育 72 h 后,甲基化水平有所减弱,而非甲基化基因增多。RT-PCR 显示 EGCG 呈剂量和时间依赖性促进 A2780 细胞 RASSF1A 基因 mRNA 和蛋白表达。 **结论** EGCG 能使 RASSF1A 基因去甲基化,并上调其非甲基化基因和蛋白的表达水平,这可能是其抗肿瘤的重要机制。

关键词: 卵巢癌细胞; 表没食子儿茶素没食子酸酯; Ras 相关区域家族 1 基因

中图分类号:R737.31

文献标识码:A

文章编号:2095-1116(2011)03-0273-04

Effect of EGCG on Methylation and Expression of RASSF1A in Ovarian Cancer Cell Line A2780

SHEN Qing-xiang, WEI Fu-qiao

(Department of Gynecology, the Second Affiliated Hospital, University of South China,
Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of epigallocatechin-3-gallate(EGCG) on RASSF1A methylation and protein expression in a cell line of A2780. **Methods** The cultured A2780 cells were incubated with EGCG for 24~76 h. After that, DNA was extracted, and the methylation in RASSF1A promoter region was determined by methylation-specific PCR(MSP). The mRNA and protein level of RASSF1A was detected by RT-PCR and Western blot. **Results** PCR results showed non-methylation band and methylation band was detected when A2780 cells was under quiescent condition. When the cells were incubated with 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG, the methylation band level was decreased, and the non-methylated DNA was increased. RT-PCR and Western blot also showed the mRNA level of RASSF1A was increased in dose and time-dependent manner. **Conclusion** Demethylation of RASSF1A and increasing its mRNA and protein induced by EGCG may be one of the mechanisms of its antineoplastic activity.

Key words: epigallocatechin-3-gallate; ovarian cancer; ras-association domain family 1

卵巢癌是妇科死亡率最高的恶性肿瘤^[1],其发生发展是一个多因素、多基因的漫长过程,其中包括癌基因的激活或抑癌基因的失活。Ras 相关区域家

族 1 基因(ras-association domain family 1, RASSF1)是近年来新发现的抑癌候选基因,它包括 RASSF1 A~E 等 7 种转录本^[2]。研究表明,在多种肿瘤组织

中 RASSF1A 表现为低表达或者甲基化而失活^[3,4]。因此,以上述分子为出发点是近年来抗肿瘤药物研究的热点。卵巢癌早期缺乏特异性的诊断指标,患者在出现症状和体征时往往已进展到晚期,因此化疗依然是治疗的重要手段。尽管对卵巢癌的诊断和治疗水平不断改善,但其生存率依然没有明显的提高^[5,6]。药物的副作用以及耐药肿瘤细胞的产生是5年生存率低下的主要原因^[1,7,8]。近年来,天然抗肿瘤药物已经逐渐引起医学界的重视。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是从绿茶中所提取出的一种多酚,它对胃肠道肿瘤、前列腺癌、血液病以及宫颈癌等多种恶性肿瘤具有明显的抑制作用^[9,10]。除此之外,EGCG 还具有抗突变、抗炎、抗感染以及清除自由基等效应^[10,11]。本研究试图探讨 EGCG 对卵巢细胞系 A2780 RASSF1A 的表达水平以及甲基化有无影响,从而为 EGCG 在卵巢癌中的治疗价值提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人卵巢癌细胞系 A2780 购自武汉典型培养物保存中心,于37℃ 5% CO₂ 条件下,用含10%胎牛血清(杭州四季青)、1 mmol/L 谷氨酰胺、1%青霉素和1%链霉素(上海生工)以及1.5 g/L Na₂HCO₃ (Sigma)的RPMI-1640 培养基(Invitrogen)培养。EGCG(纯度95%)购自Sigma公司,用二甲基亚砜(DMSO, Sigma)溶解,-20℃保存,临用前用培养基稀释至所需浓度,DMSO 终浓度不超过0.1% (v/v)。

1.2 乳酸脱氢酶检测

A2780 细胞接种于96孔板中(细胞数约1×10⁴,100 μL/孔),24 h后加入50 μmol/L EGCG 或0.1% DMSO(对照组)。采用CytoTox 96®细胞毒性分析试剂盒(Promega)检测LDH的释放情况。LDH漏出率(%)=实验组LDH产生量/细胞LDH最大释放量×100%。

1.3 甲基化特异性 PCR 检测 RASSF1A 启动子区域甲基化

细胞处理结束后,采用Qiagen公司的DNA提取试剂盒从A2780细胞中提取DNA,紫外分光光度计测定其浓度。并按照文献[12]方法,设计甲基化和非甲基化引物,并对化学修饰后的DNA进行扩增,本文所采用的引物序列见表1。扩增条件为:95℃ 预变性12 min,随后进入95℃ 30 s,58℃ 45 s、72℃ 60 s的循环,共计35个循环,末次循环后于

72℃ 10 min,终止反应。取10 μL PCR产物,经2%琼脂糖电泳、鉴定。

表1 引物信息

引物	引物序列(5'-3')	产物长度
RASSF1A-MF	GTG TTA ACG CGT TGC GTA TC	96 bp
RASSF1A-MR	AAC CCC GCG AAC TAA AAA CGA	
RASSF1A-UF	TTT GGT TGG AGT GTG TTA ATG TG	
RASSF1A-UR	CAA ACC CCA CAA ACT AAA AAC AA	108 bp
RASSF1A-F	TCT GGG GCG TCG TGC GCA AA	
RASSF1A-R	GAA CCT TGA TGA AGC CTG TG	
β-actin-R	CCT TCC TGG GCA TGA GTC CT	284 bp
β-actin-F	GGA GCA AT GAT CTT GAT CTT	
		204 bp

1.4 RT-PCR 检测 RASSF1A mRNA 表达

收集1×10⁶个细胞,按照文献[13]方法用Trizol(Invitrogen)试剂提取RNA,先逆转录成cDNA,按以下条件进行PCR扩增:95℃ 5 min,随后进入40个循环:94℃ 30 s,54℃ 40 s,72℃ 60 s。最终72℃ 10 min。同时以β-actin为作内参,反应结束后,产物经琼脂糖电泳鉴定。

1.5 Western blot 检测 RASSF1A 蛋白的表达

EGCG 处理结束后,用4℃ PBS快速洗涤2次,随后加入100 μL蛋白抽提试剂盒提取核蛋白(江苏碧云天公司)。BCA定量(Pierce)后取20 μL蛋白与等量2×SDS—上样缓冲液于100℃ 5 min后用于SDS-PAGE。电泳结束后转膜,孵育anti-RASSF1A多克隆抗体(Santa Cruz),洗膜,孵育二抗(北京中杉),ECL发光显影(Pierce)。同时选用β-actin作为内部参照(北京中杉)。

1.6 统计学分析

所有实验重复3次,用SPSS 13.0行Dunnett's分析,以P<0.05判定为差异有显著性。

2 结 果

2.1 EGCG 的细胞毒性实验

为了测试不同浓度的EGCG对A2780细胞有无毒性,对细胞LDH的漏出情况进行了检测。如图1所示,给予大剂量80 μmol/L EGCG处理A2780细胞后,与DMSO对照组比较,24~72 h内细胞所释放的LDH无明显差异(P=0.068)。这表明该浓度范围内EGCG对A2780细胞并无细胞毒性。细胞增殖抑制实验表明,EGCG对A2780细胞抑制的

IC₅₀为 50 μmol/L(数据未显示)。因此随后的研究采用 50 μmol/L 作为处理浓度。

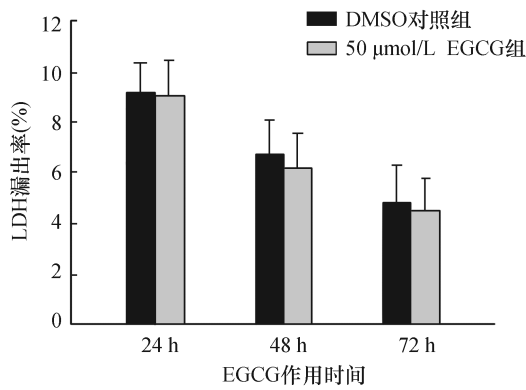


图1 EGCG 对 A2780 细胞 LDH 释放的影响

2.2 EGCG 对 A2780 细胞 RASSF1A 基因甲基化的影响

甲基化特异性 PCR 结果显示,A2780 细胞静息状态下(0 h),可观察到 RASSF1A 基因启动子区域有明显的甲基化条带和非甲基化条带。当 A2780 细胞与 10 ~ 50 μmol/L EGCG 孵育 72 h 后,甲基化条带明显减弱(图 2),而非甲基化条带增加。

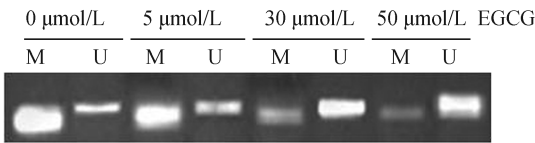


图2 EGCG 对 A2780 细胞 RASSF1A 甲基化影响
M: 甲基化 RASSF1A; U: 非甲基化 RASSF1A

2.3 不同剂量 EGCG 对 A2780 细胞 RASSF1A 基因 mRNA 表达的影响

0、10、30、50 μmol/L EGCG 与 A2780 细胞孵育 96 h 后, RT-PCR 结果显示,与对照组比较, RASSF1A 基因 mRNA 随 EGCG 浓度的增加而增高 ($P < 0.05$),表明 EGCG 能增高细胞中 RASSF1A 基因 mRNA 的表达水平(图 3)。

2.4 不同剂量 EGCG 对 A2780 细胞 RASSF1A 蛋白表达的影响

EGCG 作用于 A2780 细胞前,RASSF1A 呈低表达状态。经 10、30、50 μmol/L EGCG 处理后, RASSF1A 蛋白水平随着 EGCG 浓度的增高而增高 ($P < 0.05$),而内参 β-actin 在所有处理组中保持不变,灰度扫描结果见图 4。

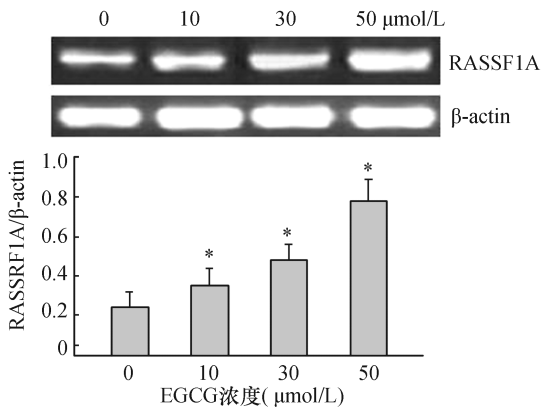


图3 不同浓度 EGCG 对 A2780 细胞 RASSF1A mRNA 表达的影响

* :与对照组(0 μmol/L)比较, $P < 0.05$

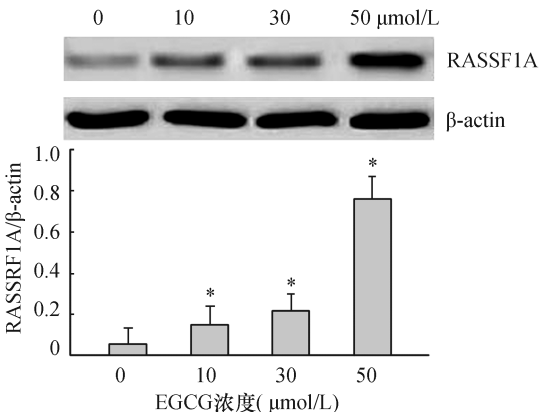


图4 不同浓度 EGCG 对 A2780 细胞 RASSF1A 蛋白表达的影响

* :与对照组(0 μmol/L)比较, $P < 0.05$

3 讨 论

随着上世纪末学者提出的抑癌基因甲基化可导致肿瘤的发生以来,人们逐渐把注意力由经典的核遗传学转移到了表观遗传学,即不涉及 DNA 序列的变化,但可以通过 DNA 甲基化、蛋白修饰或 RNA 干扰等方式作为肿瘤细胞可遗传的基因表达模式。其中以 DNA 甲基化最常见,尤其是抑癌基因甲基化可导致基因转录异常从而引起细胞异常增殖。卵巢癌细胞中抑癌基因 RASSF1A 是目前研究的热点,53.3% 的患者存在高甲基化,且卵巢组织 RASSF1A 蛋白的表达水平明显低于正常人或良性卵巢肿瘤组织。因此逆转其甲基化、上调 RASSF1A 的表达水平有望成为卵巢癌治疗的重要途径^[14]。

紫杉醇和铂类药物联合化疗是治疗卵巢癌的重要方法,但随之而来的耐药细胞株的产生是导致治

疗失败从而引起患者死亡的主要原因^[8]。随着近年来传统中药中的抗癌成分日益受到医学界的关注,茶多酚由于具有广泛的抗肿瘤药理活性而成为当今的研究热点^[15]。茶多酚是茶叶的主要成分,其含量占茶叶干重的 30%。茶多酚中大部分成分为黄烷醇,即儿茶素,包括 EGCG、表没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯和表儿茶素。生物活性以 EGCG 最强,包括抗菌、抗炎、抗氧化以及免疫调节等功能^[16]。随着对 EGCG 认识的不断深入,目前以从传统的抗炎领域拓展到肿瘤研究当中。

在本研究发现 A2780 细胞在静息状态下,细胞内可扩增出明显的甲基化 RASSF1A 基因和非甲基化条带,表明卵巢癌细胞在正常状态下部分 RASSF1A 基因处于甲基化状态。当 A2780 细胞经 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 处理 72 h 后,甲基化条带明显减弱,而非甲基化基因有所增加,表明 EGCG 能逆转肿瘤细胞 RASSF1A 基因的甲基化状态。随后的 RT-PCR 和 Western blot 实验也证实 EGCG 能在 mRNA 和蛋白水平增加 RASSF1A 基因的表达水平。

EGCG 逆转 RASSF1A 基因甲基化的机制还不清楚,肿瘤细胞甲基化的过程中,甲基供体不足,或者通过去甲基化机制使肿瘤细胞重新抑癌基因可能是其作用的方式^[17]。总之,本研究结果进一步证实了 RASSF1A 基因与卵巢癌的发生发展密切相关,EGCG 能使其重新获得表达并恢复其抑制肿瘤生长的功能,因此它可作为一种甲基化抑制剂,有可能为卵巢癌治疗新的辅助药物。

参考文献:

- [1] Hope JM, Blank SV. Current status of maintenance therapy for advanced ovarian cancer[J]. *Int J Women Health*, 2010, 1: 173-180.
- [2] Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796 (2): 114-128.
- [3] Oceandy D, Cartwright EJ, Neyses L. Ras-association domain family member 1A (RASSF1A)-where the heart and cancer meet[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2009, 19(8): 262-267.
- [4] Yazici H, Terry MB, Cho YH, et al. Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA before breast cancer diagnosis in the breast cancer family registry[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(10): 2723-2725.
- [5] Kandalaft LE, Powell DJ Jr, Singh N, et al. Immunotherapy for ovarian cancer: what's next[J]. *J Clin Oncol*, 2010.
- [6] Jensen SE, Rosenbloom SK, Beaumont JL, et al. A new in-

- dex of priority symptoms in advanced ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2010.
- [7] Jutras S, Bachvarova M, Keita M, et al. Strong cytotoxic effect of the bradykinin antagonist BKM-570 in ovarian cancer cells-analysis of the molecular mechanisms of its antiproliferative action. LID - 10. 1111/j. 1742-4658. 2010. 07928. x [doi][J]. *FEBS J*, 2010.
- [8] Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, et al. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010, 10(3): 268-278.
- [9] Tu SH, Ku CY, Ho CT, et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits nicotine-and estrogen-induced $\alpha 9$ -nicotinic acetylcholine receptor upregulation in human breast cancer cells[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010.
- [10] Zhang H, Cao D, Cui W, et al. Molecular bases of thioredoxin and thioredoxin reductase-mediated prooxidant actions of (-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010.
- [11] Yu L, Zhao Y, Fan Y, et al. Epigallocatechin-3 gallate, a green tea catechin, attenuated the downregulation of the cardiac gap junction induced by high glucose in neonatal rat cardiomyocytes[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 26 (3): 403-412.
- [12] Honda S, Haruta M, Sugawara W, et al. The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(5): 1117-1125.
- [13] Zuo S, Chen Y, Xu L, et al. Re-expression of RASSF1A by 5-Aza-CdR induced demethylation of the promoter region in human biliary tract carcinoma cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2007, 27(3): 281-284.
- [14] Chaudhry P, Srinivasan R, Patel FD. Utility of gene promoter methylation in prediction of response to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer (EOC) [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(8): 877-884.
- [15] Lambert JD, Sang S, Hong J, et al. Anticancer and anti-inflammatory effects of cysteine metabolites of the green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(18): 10016-10019.
- [16] Ahmed S. Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate in arthritis: progress and promise[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(2): 208.
- [17] Zhu BT, Shim JY, Nagai M, et al. Molecular modelling study of the mechanism of high-potency inhibition of human catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin-3-O-gallate[J]. *Xenobiotica*, 2008, 38(2): 130-146.

(此文编辑 朱雯霞)